

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：17702

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09311

研究課題名(和文) Apop遺伝子制御に基づく健康寿命延伸方法の創出

研究課題名(英文) Creation of health expectancy extension method based on Apop gene regulation

研究代表者

安田 修 (Yasuda, Osamu)

鹿屋体育大学・スポーツ生命科学系・教授

研究者番号：00372615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：Apop遺伝子は、動脈硬化血管の平滑筋細胞で発現している遺伝子としてクローニングされた。機能不明の遺伝子とされていたが、アポトーン誘導機能を有し、エネルギーであるATPの産生を含むミトコンドリア機能の調整に関わっていることが明らかになった。Apop遺伝子の発現は脂肪酸代謝に影響し、生活習慣病の発症に関わっている。本研究によってApop遺伝子の発現が健康寿命に影響し得ることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈硬化によって発症する脳卒中、心筋梗塞は日本における死因の常に上位を占める疾患であり、高齢者の寝たきりの原因としても重要である。Apop遺伝子発現の調整によって生活習慣病を抑制することにより、これらの疾患の発症を抑制しうると考えられる。また高齢者において介護の必要性が高まり、社会的にも重要な問題となっているフレイルの発症を抑制しうると考えられ、健康寿命を延伸する効果が期待される。

研究成果の概要(英文)：The Apop gene was cloned as a gene expressed in smooth muscle cells of arteriosclerotic vessels. Although it was a gene of unknown function, it was revealed that it has an apoptosis-inducing activity and is involved in the regulation of mitochondrial function including the production of ATP. Expression of the Apop gene affects fatty acid metabolism and is involved in the development of lifestyle-related diseases. This study showed that the expression of the Apop gene can affect healthy life expectancy.

研究分野：老年医学

キーワード：ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 動脈硬化遺伝子

心疾患および脳血管疾患は、常に本邦における死因の上位に位置している。これらの疾患の原因となっている病態は、血管の老化である動脈硬化である。ApoE ノックアウトマウスは高コレステロール血症により動脈硬化を自然発症し、動脈硬化研究のためにしばしば用いられる動脈硬化モデルマウスである。生後半年以内に大動脈に動脈硬化プラークが形成され、肉眼的に観察することが可能である。我々は ApoE ノックアウトマウスの動脈硬化プラークを摘出し、そこから細胞を培養することに成功した。免疫染色によって確認したところ、培養された細胞は平滑筋細胞であることが確認された。動脈硬化は血管平滑筋細胞が増殖することによって形成されることから、予想される結果であった。この動脈硬化プラーク由来平滑筋細胞の遺伝子発現プロファイルを正常血管由来の平滑筋細胞と比較した。その結果、いくつかの遺伝子発現に違いが発見された。そのなかのひとつは VIII 型コラーゲンであった。VIII 型コラーゲンは細胞外基質のひとつであり、細胞外基質は細胞の増殖や形質に影響を与えることが知られている。VIII 型コラーゲンが動脈硬化プラークの形成に重要な役割を果たしていることは、世界的にも認識され、多くの成果が報告されている (Circ Res 104,609,2009; Am J Pathol 182,2241,2013; Curr Pharm Des 21,1124,2015)。

### (2) Apop 遺伝子

Apop 遺伝子は、正常血管由来の平滑筋細胞よりも、動脈硬化プラーク由来の平滑筋細胞において高レベルに発現している遺伝子として発見された。192 アミノ酸より構成されるタンパク質をコードしており、機能性ドメインも存在していないことから機能は不明であった。そこで、この遺伝子の機能推定のため、発現ベクターを構築し、培養平滑筋細胞に導入した。導入された細胞はアポトーシス (能動的な死) を起こして死滅した。そこでこの遺伝子を、Apoptogenic protein (Apop) 遺伝子と名付けた。細胞のアポトーシスが進行する過程においては caspase 経路と呼ばれる一連の酵素が活性化される。Apop 遺伝子を導入した細胞においても caspase 経路が活性化されていた。またミトコンドリアからのチトクローム c 放出が起こり、放出されたチトクローム c がアポトソームと呼ばれる複合体を形成して caspase 経路を活性化していた (図 1)。このことは、Apop 遺伝子発現によるアポトーシスは、ミトコンドリアを起源として起こっていることを示している。Apop 遺伝子の N 末端にはミトコンドリア移行シグナルと思われる配列が存在していることから合理的な結果であった。免疫染色の結果からも Apop は細胞内のミトコンドリアに局在していることが明らかにされた。以上の結果から、動脈硬化プラーク由来の Apop 遺伝子の機能はアポトーシス誘導であった。また、ミトコンドリア蛋白質である Apop は、発現によってミトコンドリアからチトクローム c を放出させ、放出されたチトクローム c が一連の caspase 経路を活性化させてアポトーシスを誘導していることが明らかにされた。

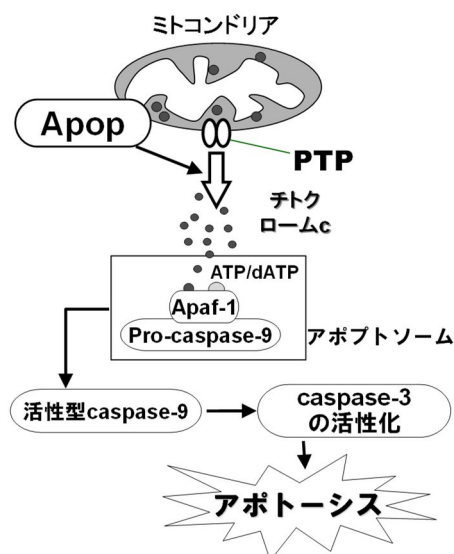


図 1. Apop 発現による PTP 依存性のアポトーシス経路

## 2. 研究の目的

世界的にも例のない速さで超高齢社会となった我が国にとって、高齢者の健康寿命を延伸することは高齢者の生活の質を改善し、医療経済を支えるための最重要課題である。本研究においては申請者が独自に発見した Apop 遺伝子の発現調節が健康寿命の延伸に効果を与えることを明らかにする。Apop はミトコンドリア膜上に存在し、ミトコンドリア機能を調整する重要な因子である。ミトコンドリア機能は生体のエネルギー代謝に影響しているだけでなく、寿命延伸にも大きな影響を及ぼすことが知られている。我が国にとって最重要課題のひとつである健康寿命の延伸方法を創出することを本研究の全体構想のなかでの目標とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 組織解析

一般に生活習慣病に罹患した個体では脂肪組織が増加し、老化した個体では線維化が進行することが知られている。Apop ノックアウトマウスの脂肪組織の定量的評価、および組織線維化の評価を行う。ミトコンドリアの多い組織に関しては電子顕微鏡によるミトコンドリアの形態観

察、ならびに定量的な評価を行う。ミトコンドリアの機能評価として、電子伝達系によるエネルギー生産機能について解析する。Apop ノックアウトマウスの組織および細胞を用いて電子伝達系の機能測定を行う。

## (2) 行動解析

Apop ノックアウトマウスにおいてはミトコンドリア活性の変化が見られる。ミトコンドリア活性の変化はマウスにおいては行動の変化として現れる可能性がある。そこで Apop ノックアウトマウスと野生型マウスを用いて行動の評価を行う。運動量、摂餌量、運動耐用量等の評価を行う。

## 4. 研究成果

(1) ミトコンドリアは独自の DNA (ミトコンドリア DNA) を有し、2 重の生体膜からなる細胞内の小器官である。複数の重要な機能を持つなか、最大の機能であるエネルギー生産のほか、細胞の能動的な死であるアポトーシスを司っている。アポトーシスは、ウイルスに感染した細胞の処理や、がん化した細胞が排除される時に起こっている。アポトーシスによって、ほとんどの腫瘍の成長は未然に防がれているが、まれにアポトーシスが起こらなかつた場合、細胞はがん細胞へと変化して癌を発症するとされる。Apop タンパク質は、これらの重要な機能を有するミトコンドリアに存在している。N 末端近くにミトコンドリア移行シグナルが存在する (図 2)。従つて Apop はこれらの重要な機能に関わっていると考えられる。細胞を用いた研究の結果から Apop はアポトーシスに関わっていると考えられていたが、本研究の成果によってエネルギー生産にも関わっていることが示唆された。ミトコンドリアの持っている機能の亢進は寿命にも関わっており、Apop 発現は健康寿命に影響することが示唆された。

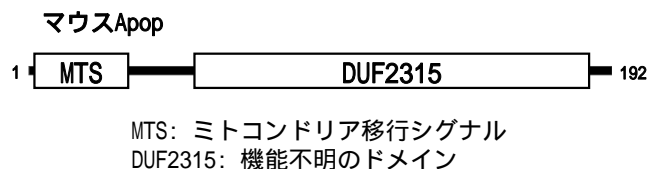


図 2. Apop の構造

(2) Apop 遺伝子を欠損したノックアウトマウスの解析によって、Apop 発現は脂肪組織の大きさに影響することが明らかになった。特に内臓脂肪の減少が認められている。内臓脂肪は健康寿命に影響を与える生活習慣病の発症に関わっていることが知られており、Apop 発現が健康寿命に影響することを示唆する結果であった。脂肪の蓄積に伴う肥満は、糖尿病や高血圧、脂質異常症などの生活習慣病の発症に大きく関与している。とくに日本では、BMI で高度肥満者と判定される人口は少ないにも関わらず、2 型糖尿病などの発症は欧米に匹敵するとされており、肥満による健康障害の発症は多い。Apop ノックアウトマウスでは血中コレステロール値も低下しており、Apop 発現の健康状態への影響は大きいことが示唆された。

(3) 認知症の発症予防は高齢者人口が増加し続けている本邦にとって重要な課題である。認知症は、認知機能低下によって健康寿命を損なうだけでなく、活動性の低下をもたらすフレイル発症によって健康寿命に大きく影響する。日本では 65 歳以上の高齢者の約 15% が認知症に罹患しているとされ、今後も増えていくと予想される。認知症では記憶力が低下するだけでなく、怒りやすくなる、徘徊する、などの症状が見られるため、家族の負担は大きくなる。Apop 遺伝子を欠損したノックアウトマウスを解析した結果、Apop 欠損による認知機能の低下は認められなかった。この結果は Apop 発現の抑制は認知症を増悪させないことを示している。Apop ノックアウトマウスにおいては摂餌量の低下は認められなかったが、脂肪組織の低下が認められた。したがって Apop 発現抑制による脂肪組織の減少は食事量の減少によるものではなく、脂肪の蓄積に直接的に影響しているものと考えられる。Apop 発現が生活習慣病の発症を抑制する一方で、認知症の発症は増加させないことを示す結果であった。

(4) ミトコンドリアが有している重要な機能のなかで、最大の機能はエネルギーである ATP の生産である。生体における ATP の 95% 以上を生産している。細胞質で行われる解糖系では、1 分子のグルコースから生産される ATP は 2 分子であるのに対し、ミトコンドリアでの生産を加えると 38 分子の ATP が生産される。効率よく ATP を生産するため、ミトコンドリアにはトリカルボン酸サイクルと電子伝達系が備わっている。特にミトコンドリア二重膜の内膜に備わっている電子伝達系はミトコンドリア内膜の電位の勾配を利用した酸化的リン酸化を行っている場であり、多くの ATP を生産している。本研究における結果から、Apop の発現はこの電子伝達系の活性に影響

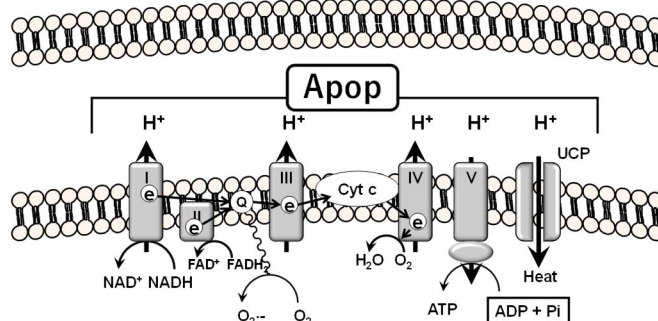


図 3. ミトコンドリアの電子伝達系

していると考えられる(図3)。Apopの発現を制御することによって効率よくエネルギーを生産させ、細胞機能を活性化させるだけでなく、生体を活性化させることも可能であると考えられる。高齢者においては、骨格筋量の減少によるフレイルの発症が社会的な問題となっている。骨格筋、特に赤筋にはミトコンドリアが豊富に存在し運動のためのエネルギー源となっている。Apop発現制御によって骨格筋のエネルギーを効率よく生産させ、フレイルを防止し、健康寿命を延伸することが可能になると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kim-Mitsuyama Shohei, Soejima Hirofumi, Yasuda Osamu, Node Koichi, Jinnouchi Hideaki, Yamamoto Eiichiro, Sekigami Taiji, Ogawa Hisao, Matsui Kunihiko	4. 巻 42
2. 論文標題 Anemia is an independent risk factor for cardiovascular and renal events in hypertensive outpatients with well-controlled blood pressure: a subgroup analysis of the ATTEMPT-CVD randomized trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 883 ~ 891
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-019-0210-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kim-Mitsuyama Shohei, Soejima Hirofumi, Yasuda Osamu, Node Koichi, Jinnouchi Hideaki, Yamamoto Eiichiro, Sekigami Taiji, Ogawa Hisao, Matsui Kunihiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Total adiponectin is associated with incident cardiovascular and renal events in treated hypertensive patients: subanalysis of the ATTEMPT-CVD randomized trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-52977-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Miyamoto Naokazu, Hirata Kosuke, Miyamoto-Mikami Eri, Yasuda Osamu, Kanehisa Hiroaki	4. 巻 8
2. 論文標題 Associations of passive muscle stiffness, muscle stretch tolerance, and muscle slack angle with range of motion: individual and sex differences	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-26574-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Osamu Yasuda, Yasunari Fujii, Risa Komaki, Yu aginuma Toshiki Moriyama	4. 巻 56
2. 論文標題 Analysis of muscle mass and renal function markers in young athletes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Campus Health	6. 最初と最後の頁 137-142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kim-Mitsuyama Shokei, Soejima Hirofumi, Yasuda Osamu, Node Koichi, Jinnouchi Hideaki, Yamamoto Eiichiro, Sekigami Taiji, Ogawa Hisao, Matsui Kunihiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Cardiovascular and renal protective role of angiotensin blockade in hypertension with advanced CKD: a subgroup analysis of ATTEMPT-CVD randomized trial	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-20874-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yasuda O, Ikeda Y, Ohishi M	4. 巻 54
2. 論文標題 Kumamoto Earthquake and health issues of the elderly	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nihon Ronen Igakkai Zasshi	6. 最初と最後の頁 120-124
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Osamu Yasuda, Yasunari Fujii, Risa Komaki, Hisayo Yasuda, Toshiaki Moriyama, Yuji Soejima	4. 巻 55
2. 論文標題 Correlation between renal function and muscle mass	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Campus Health	6. 最初と最後の頁 133-137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kim-Mitsuyama Shokei, Soejima Hirofumi, Yasuda Osamu, Node Koichi, Jinnouchi Hideaki, Yamamoto Eiichiro, Sekigami Taiji, Ogawa Hisao, Matsui Kunihiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Reduction in hsCRP levels is associated with decreased incidence of cardiovascular events in Japanese hypertensive women but not in men	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17040
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-73905-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 安田 修
2. 発表標題 アスリートを対象とした腎機能マーカーと筋肉量の解析
3. 学会等名 第42回日本高血圧学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安田 修
2. 発表標題 若年アスリートにおける筋肉量と腎機能の評価
3. 学会等名 第56回全国大学保健管理研究集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安田 修、藤井 康成、小牧 梨沙、添嶋 裕嗣
2. 発表標題 若年アスリートにおける筋肉量と腎機能に関する解析
3. 学会等名 第55回全国大学保健管理研究集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 副島 弘文、安田 修、中山 秀樹、辻田 賢一、小川 久雄
2. 発表標題 歯周病菌はヒト動脈内に認められる
3. 学会等名 第65回日本心臓病学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasuda H, Yasuda O, Tsujita K
2. 発表標題 Significance of Mitral Regurgitation after Aortic Valve Replacement in Severe Aortic Stenosis Patients
3. 学会等名 The 82nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	福尾 恵介  (Fukuo keisuke)  (40156758)	武庫川女子大学・生活環境学部・教授   (34517)	
研究分担者	大石 充  (Ohishi Mitsuru)  (50335345)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授   (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------